



**Universidad
Zaragoza**



Trabajo Fin de Grado

Caracterización química de distintas variedades de manzanas

Autora

Sara Brocate San Juan

Director

Ricardo López Gómez

Departamento de Química Analítica

Curso 2019-2020

A Elayma, por su ayuda, ya que sin ella no habría sido posible

*A todos mis profesores, en especial a Ricardo,
que me han ayudado a conseguir este trabajo en tiempos difíciles.*

A mi familia, que me ha apoyado siempre

Gracias a todos

Resumen

Las manzanas presentan compuestos volátiles que son responsables de su aroma característico y además tienen gran influencia en la calidad de la manzana. En este trabajo se obtienen extractos representativos por un sistema de P&T-SPE y después se estudia la composición aromática de cuatro variedades de manzanas: Golden Delicious, Granny Smith, Reineta y Fuji, identificando los compuestos más relevantes.

Se realiza un estudio olfatométrico (GC-O) tanto en el cromatógrafo de columna polar como el de apolar, mediante la técnica de frecuencia de detección, en la que un panel de 6 personas analizan el extracto representativo. Para facilitar la identificación, se hace un análisis en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas (GC-MS).

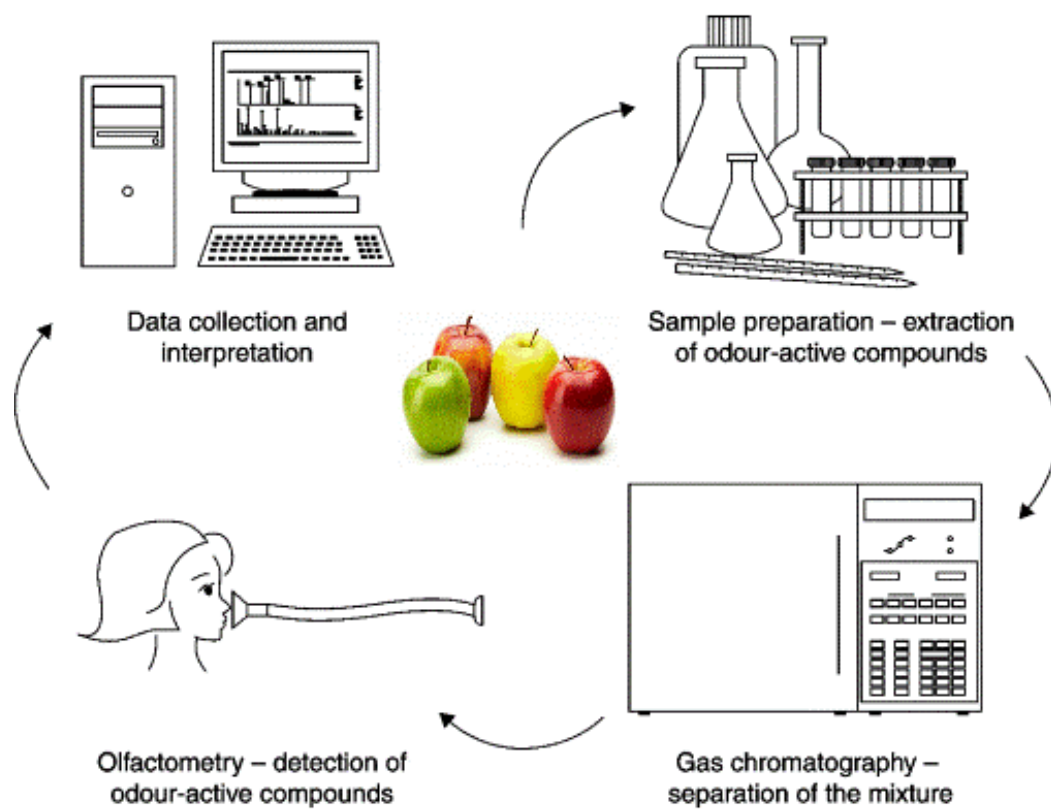
Tras los análisis se observa que hay compuestos comunes a todas las variedades que también presentan una gran importancia sensorial, como puede ser el hexanal y 2-metilbutirato de etilo. Además, también destacan, pero no son comunes en todas las muestras, el hexanoato de etilo, con descriptores como frutal, dulce, anisado y el TCA, como corcho, humedad, cloro.

Abstract

Apples have volatile compounds that are responsible for their characteristic aroma and also have a great influence on the quality of the apple. In this work, representative extracts are obtained by a P&T-SPE system and then the aromatic composition of four apples varieties is studied: Golden Delicious, Granny Smith, Reineta and Fuji, identifying the most relevant compounds.

An olfactometric study (GC-O) is carried out both in the polar and apolar column chromatographs, using the detection frequency technique, in which a panel of 6 people analyze the representative extract. To facilitate identification, an analysis is made on a gas chromatograph coupled to a mass spectrometry detector (GC-MS).

After the analysis, it is observed that there are compounds common to all varieties that also have great sensory importance, such as hexanal and ethyl 2-methylbutyrate. In addition, ethyl hexanoate also stands out, but is not common in all samples, with descriptors such as fruit, sweet, aniseed and TCA, such as cork, moisture, chlorine.



Índice

1.	Introducción	1
1.1	El aroma de la manzana	1
1.2	Cromatografía de gases-olfatometría (GC-O)	2
1.3	Aplicaciones de GC-O	4
1.4	Tratamiento de muestras. Extracción de compuestos volátiles	4
1.4.1	Espacio de cabeza dinámico	4
1.4.2	Extracción en fase sólida (SPE)	4
1.4.3	Microextracción en fase sólida (SPME)	5
2.	Objetivos	5
3.	Materiales y métodos.....	5
3.1	Muestras.....	6
3.2	Obtención de extractos representativos de las manzanas	6
3.3	Estudio olfatométrico.....	7
3.3.1	GC-O en columna polar DBWAX.....	8
3.3.2	GC-O en columna apolar DB5.....	9
3.4	Cromatografía de gases-Espectrometría de Masas (GC-MS)	9
4.	Resultados	10
4.1	Identificación de los compuestos odorantes	10
4.1.1	Tratamiento de datos.....	10
4.1.2	Identificación de compuestos responsables del aroma en las diferentes manzanas ...	11
5.	Discusión	16
5.1	Obtención del extracto representativo de las manzanas	16
5.2	Comparación entre las diferentes manzanas.....	17
6.	Conclusiones.....	20
7.	Bibliografía.....	21

1. Introducción

Las frutas producen una serie de compuestos volátiles que componen sus aromas y contribuyen a su sabor. Muchos factores afectan la composición volátil, incluida la composición genética, el grado de madurez, las condiciones ambientales, así como el manejo y el almacenamiento postcosecha⁽¹⁾.

El aroma es una de las características de la fruta más importante y es probable que los compuestos volátiles desempeñen un papel clave en la determinación de la percepción y aceptabilidad de los productos por parte de los consumidores⁽¹⁾.

Aunque las diferentes frutas comparten muchas características aromáticas, cada fruta tiene un aroma distintivo que depende de la combinación de volátiles, la concentración y el umbral de percepción de los volátiles individuales⁽¹⁾.

Como un rasgo importante de la calidad de la fruta, el aroma ha ganado una atención creciente en los últimos años. Con el rápido desarrollo de la ciencia y la tecnología, especialmente la aplicación de GC-MS y otros instrumentos analíticos, se ha avanzado en la investigación de aromas en varios campos⁽¹⁾.

1.1 El aroma de la manzana

La manzana es un fruto consumido desde la antigüedad, que gracias a la enorme adaptabilidad de sus variedades a los diversos ecosistemas, se ha extendido a diversas regiones, de forma que está entre los frutos más comercializados⁽²⁾.

Las manzanas producen compuestos volátiles químicos que son responsables del aroma característico del fruto y además tienen influencia en la calidad de la manzana. La tecnología actual ha permitido conocer unos 400 compuestos volátiles y su biosíntesis involucra enzimas como lipoxigenasa, alcohol deshidrogenasa, alcohol aciltransferasa y substratos tales como carbohidratos, proteínas y lípidos⁽²⁾.

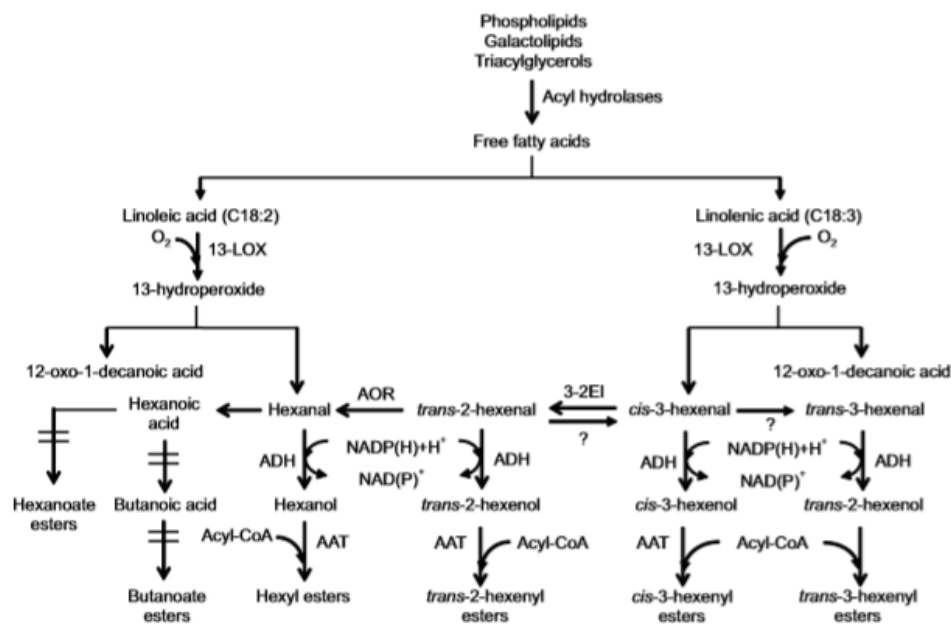


Figura 1: Transformaciones bioquímicas a ésteres⁽³⁾

Entre los compuestos volátiles se encuentran ésteres, alcoholes, aldehídos, ácidos, acetales, éteres, hidrocarburos y cetonas⁽³⁾. Los aldehídos son los compuestos volátiles predominantes en manzanas inmaduras mientras que en frutas maduras se encuentran en mayor concentración alcoholes y ésteres. Estos últimos con los compuestos que predominan en la mayoría de manzanas⁽²⁾.

El sabor (gusto + aroma) a manzana depende de la percepción y de una combinación de compuestos volátiles y no volátiles. De estos componentes, los volátiles son los responsables de las características únicas del aroma que distinguen a la manzana y ejercen una gran influencia en la aceptación del consumidor. Por ello es importante el conocimiento de los aspectos relacionados con los compuestos volátiles presentes en la manzana, así como de los factores que pueden afectar la síntesis y concentración de éstos⁽²⁾.

1.2 Cromatografía de gases-olfatometría (GC-O)

En la década de los cincuenta, se inventó la cromatografía de gases y no fue hasta 1964 cuando se desarrolló la técnica de olfatometría, que consistía en un “cromatógrafo de gases modificado” que incorpora la nariz humana como detector cromatográfico. Esto permitía asignar descriptores olfativos a los picos del cromatograma, además de detectar olores con la nariz humana que el detector instrumental no podía registrar, ya que para ciertos compuestos, la nariz tiene un límite sensorial mucho más bajo que el detector usado en el cromatógrafo de gases^{(4) (5)}.

Es una técnica analítica muy importante en el análisis de los alimentos, que nos permite separar todos los volátiles presentes en una mezcla. Cada uno eluye individualmente por el puerto olfatométrico y es percibido por un catador que será capaz de describir y cuantificar la intensidad aromática de los compuestos. Así se asignará a cada pico cromatográfico un descriptor olfativo⁽⁶⁾.

Se introduce un extracto aromático representativo de la muestra a través del inyector, de manera que los componentes de la muestra se van a separar en la columna. A la salida de la columna, se divide por un lado al detector químico y por otro al puerto de “sniffing” que es donde se sitúa la nariz del analista. De esta manera, nos permite relacionar la información química que aportan los detectores químicos con la información sensorial que aporta la nariz humana, y así detectar los compuestos volátiles aromáticamente activos. Además, como se puede ver en la figura, el efluente caliente se mezcla con el aire humidificado para evitar la deshidratación de las fosas nasales.

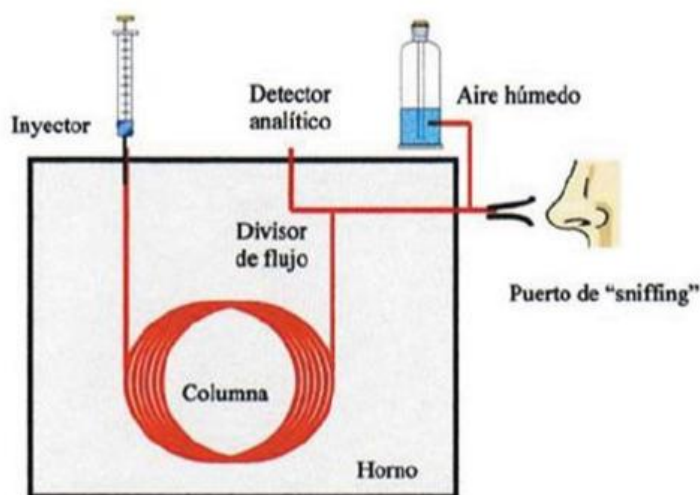


Figura 2: Esquema del acoplamiento entre la cromatografía de gases y la olfatometría⁽⁶⁾

Las diferentes técnicas olfatométricas se agrupan en técnicas de dilución, técnicas de frecuencia de detección, técnicas de tiempo-intensidad y las técnicas de intensidad posterior⁽⁷⁾.

En cuanto a la técnica de frecuencia de detección, un panel de analistas analiza un mismo extracto aromático mediante GCO. Para cada individuo se registran los tiempos de retención en los que se detectan olores, la descripción y la intensidad (1=muy débil, 2=olor claro, 3=olor intenso) siendo válidos números enteros y semienteros⁽⁴⁾⁽⁷⁾.

Tras los análisis, se determina el número de analistas que perciben cada olor, de manera que los olores detectados con mayor frecuencia son los que tienen mayor importancia⁽⁴⁾.

1.3 Aplicaciones de GC-O

La GC-O es una herramienta analítica muy importante en el análisis del aroma de los alimentos ya que nos permite caracterizar el olor de un solo compuesto, o bien el olor de todos en una mezcla compleja. Es muy útil para detectar o estudiar el olor de aquellos compuestos que no pueden ser detectados con un detector analítico, o es muy difícil su detección⁽⁸⁾.

Generalmente, se emplea para detectar cantidades traza de compuestos clave responsables del aroma de determinados alimentos, o bien para la determinación de compuestos que no son propios de un alimento pero que están debido, entre otras causas, a su procesado⁽⁶⁾.

En resumen, GC-O es una técnica con una gran diversidad de aplicaciones, no solo en el estudio de frutas, sino en cualquier producto que tenga interés aromático: vinagre de vino⁽⁴⁾, pistachos⁽⁴⁾, aceite de oliva⁽⁴⁾, alimentos vegetales⁽⁹⁾ o, especias⁽⁶⁾ por citar algunos ejemplos.

1.4 Tratamiento de muestras. Extracción de compuestos volátiles

El estudio del aroma de un alimento resulta relativamente difícil, ya que la fracción volátil se caracteriza por presentar una gran complejidad, variedad de estructuras químicas y por encontrarse en muy pequeña concentración⁽⁹⁾. Por ello, es necesario la extracción y concentración de los volátiles antes de ser analizados en la cromatografía de gases.

Para la determinación de compuestos aromáticos en alimentos se han utilizado diferentes técnicas analíticas: destilación, extracción con solventes, extracción con fluidos supercríticos, técnicas de espacio de cabeza (estático y dinámico), microextracción (SPME y SBSE) de las cuales destacan⁽⁹⁾:

1.4.1 Espacio de cabeza dinámico

Consiste en el arrastre de volátiles de la muestra, con un gas inerte a un flujo controlado y pasarlos a través de una trampa donde quedan retenidos para posteriormente ser desorbidos e inyectados en el cromatógrafo para su separación.

Se distingue por un lado el espacio de cabeza dinámico, que consiste en barrer la superficie de la muestra cometida a agitación con el gas inerte, y por otro la conocida técnica de purga y trampa, que consiste en borboteo al gas a través de la muestra⁽¹⁰⁾.

1.4.2 Extracción en fase sólida (SPE)

Es muy adecuada para aislar volátiles de muestras muy diluidas. Se basa en la adsorción selectiva de los analitos con un soporte sólido, para después ser eluidos con un disolvente orgánico apropiado.

Este proceso se realiza normalmente en un cartucho mediante cromatografía de desarrollo frontal⁽¹¹⁾.

1.4.3 Microextracción en fase sólida (SPME)

Debido a sus buenas propiedades analíticas: preparación rápida de muestras, alta sensibilidad, alto factor de enriquecimiento y automatización; es una herramienta atractiva en la caracterización de los componentes del aroma en los alimentos.

En el proceso de SPME se pueden distinguir dos etapas: una primera en la que la fibra recubierta del sorbente se pone en contacto con la muestra durante un tiempo y una temperatura determinadas, de manera que se produce la migración de los analitos desde la solución a la fibra hasta que se alcanza el equilibrio. Después, se realiza la desorción térmica de los analitos retenidos por la fibra^(9,10,12).

2. Objetivos

Los objetivos de este trabajo son:

- Obtención de extractos representativos de las manzanas mediante el sistema de P&T-SPE.
- Identificación de compuestos químicos responsables de los aromas de las manzanas mediante GC-O y GC-MS.
- Comparación de los aromas percibidos en las cuatro manzanas.

3. Materiales y métodos

Los materiales empleados:


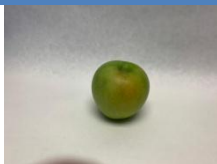


- Resina adsorbente LiChrolut®EN (Merckmilipore, Darmstad, Alemania).
- Sistema de vacío (vacuum manifold) (Agilent Technologies, CA, EEUU)
- Frascos de vidrio de borosilicato PYrex de 500 mL (FisherScientific, Reino Unido)
- Cartucho de 3 mL de polipropileno (Varian, CA, EEUU)
- Micropipetas
- Frits de polietileno (Supelco, PA, EEUU)
- Reservorio de 75 mL (Varian, CA, EEUU)
- KuDerna (Supelco, PA, EEUU)
- Viales inserto (ALWSCI Technologies, China).
- Viales (ThermoScientific, MA, EEUU).
- Jeringa de 10 µL (Hamilton Company, NV, EEUU).

Los reactivos empleados:

- Metanol (FisherScientific, Reino Unido).
- Diclorometano (FisherScientific, Reino Unido).
- Butirato de hexilo (estándar interno) (SigmaAldrich, MO, EEUU).
- Patrones de diferentes compuestos aromáticos
- Patrón comercial de mezcla de alcanos de 1000 µg/mL C7-C30 (Supelco, PA, EEUU).

3.1 Muestras

Las muestras empleadas fueron cuatro manzanas de variedades diferentes, que nos las facilitaron el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) y cada una de ellas corresponde a un grupo distinto.

GOLDEN DELICIOUS	GRANNY SMITH	REINETA	FUJI
			

3.2 Obtención de extractos representativos de las manzanas

Es necesario la captura de compuestos volátiles del espacio de cabeza y por ello se utiliza un sistema de P&T-SPE. Como se puede ver en la siguiente figura, la manzana esta en el frasco Pyrex en el que por un lado entra la corriente de N₂ de alta pureza y por el otro se pone el cartucho acondicionado de resina adsorbente LiChrolut®EN con el gel de refrigeración.



Figura 3: Dispositivo para la extracción (P&T)

Preparación y acondicionamiento de la resina LiChrolut® EN

Se utiliza un cartucho de polipropileno en el que se introduce un frit de polipropileno y 400 mg de resina y para la compactación se introduce el otro frit por encima de la resina.

Después se produce el acondicionamiento, haciendo pasar por gravedad 20 ml de CH_2Cl_2 desde un reservorio y a continuación se lleva a cabo el secado del cartucho a vacío.

Preparación muestra

Se pelan y cortan rápidamente las manzanas (aproximadamente 190 g) en trozos cúbicos de aproximadamente 1 cm^3 .

Extracción compuestos volátiles

Se añaden 190 g de manzana, preparada como se indica anteriormente, en un frasco Pyrex de 500 ml. En el frasco se realiza la captura de los volátiles del espacio de cabeza mediante el arrastre con una corriente de nitrógeno hasta un cartucho y después la extracción en fase sólida (P&T-SPE).

Se pasa una corriente de 187 ml/min de N_2 durante 6 h. Cuando el flujo está controlado, se ponen geles de refrigeración.

Después de las 6 h, se desconecta el cartucho y se seca con una corriente de N_2 suave.

Elución de los volátiles y obtención del extracto

Cuando está seco, se realiza la elución del cartucho de fase sólida con 3,2 ml de una disolución (95% CH_2Cl_2 , 5% Metanol).

Después, se adiciona 40 μl de estándar interno y sulfato de sodio.

Concentración del extracto

Empleando un matraz de tipo Kuderna se realiza la concentración con una débil corriente de N_2 hasta 200 μl , se transfiere a un vial con inserto y se almacena en frío ya preparado para el estudio olfatométrico.

3.3 Estudio olfatométrico

Para poder realizar un estudio olfatométrico es imprescindible la selección y el entrenamiento de un panel de jueces, así como el desarrollo de la terminología adecuada. El entrenamiento se efectuó siguiendo el procedimiento señalado en el laboratorio⁽¹³⁾. El análisis se realiza mediante la inyección de 1 μl de extracto tanto en el cromatógrafo de columna polar como el de apolar.

La optimización de las condiciones del estudio olfatométrico fue realizada por Manuel Aragón Capone en su Trabajo Fin de Grado⁽¹⁴⁾.

3.3.1 GC-O en columna polar DBWAX

Es un cromatógrafo de gases Trace GC 2000 (Thermoquest, Italia) con una columna DBWAX con los siguientes parámetros: 30 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interno y de 0,5 μm de espesor de fase. El hidrógeno es el gas portador y el programa de temperaturas utilizado es:

Temperatura (°C)	Rampa de temperatura (°C/min)	Tiempo (minutos)
40	-	5
100	4	-
220	6	10

Cada una de las olfatometrías se lleva a cabo por 6 *sniffers* los cuales tienen que indicar el tiempo al que detectan el aroma, su intensidad y el descriptor. El cromatograma dura 50 minutos, por lo que para evitar la saturación sensorial, se divide en dos partes, el primer juez huele del minuto 3 al 23 y el siguiente del 23 al 43. El cromatógrafo está equipado también con un detector químico de ionización en llama (FID).

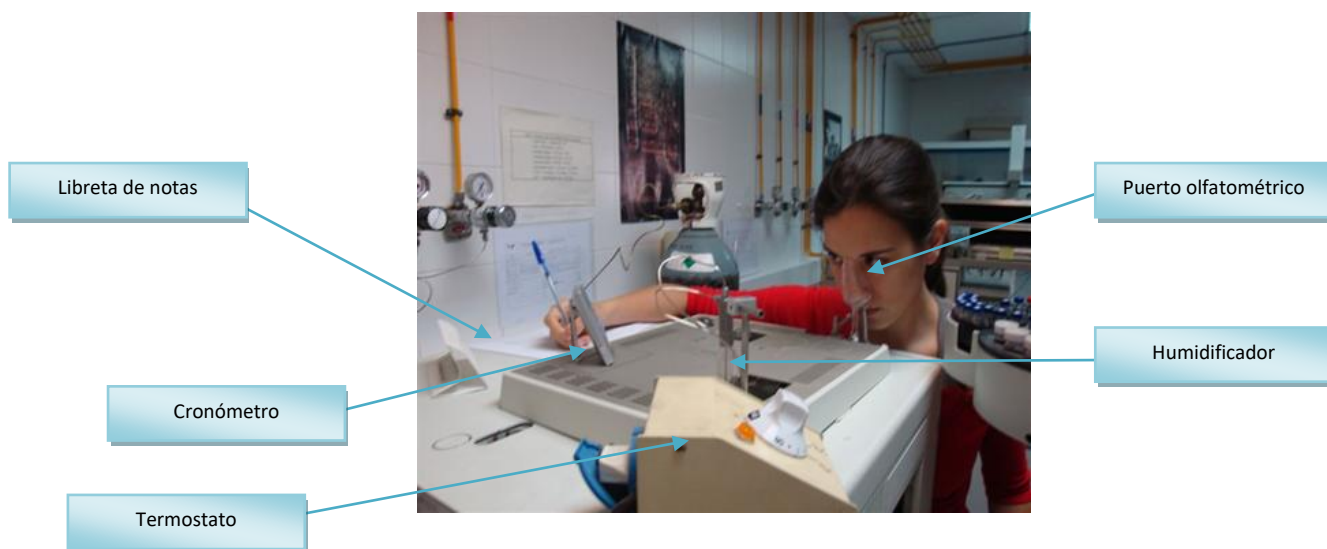


Figura 4: Panelista realizando la olfatometría

3.3.2 GC-O en columna apolar DB5

Es un cromatógrafo de gases serie 8000 (Fisons, Reino Unido) con una columna DB5 con los siguientes parámetros: 30 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interno y de 1 µm de espesor de fase.

El hidrógeno es el gas portador y el programa de temperaturas utilizado es:

Temperatura (°C)	Rampa de temperatura (°C/min)	Tiempo (minutos)
50	-	3
100	10	-
250	8	10

El tiempo total es de 37 minutos, y en este caso la olfatometría se lleva a cabo desde el minuto 3 al 25, solo un *sniffer*. El cromatógrafo está equipado también con un detector químico FID.

3.4 Cromatografía de gases-Espectrometría de Masas (GC-MS)

Para facilitar la identificación se realiza un análisis en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas. El modelo del cromatógrafo es GC-450 de Varian (Walnut Creek, CA, USA), acoplado a un detector de masas ion-trap Varian Saturn 2200.

Una columna DB-WAX UI de Agilent de 60 m × 0,25 mm × 0,25 µm, precedida por una precolumna desactivada de 3 m × 0,32 mm de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).

En este caso el gas portador es el Helio con un caudal de 1.5 ml/min y el programa de temperatura del horno es el siguiente:

Temperatura (°C)	Rampa de temperatura (°C/min)	Tiempo (minutos)
35	-	3
220	2	-
240	20	30

Se inyectaron 2 µl de extracto y se utilizó un programa de temperaturas, inicialmente a 40° C durante 0,05 minutos, después se sube con una rampa de 200°C/min hasta 300 °C y, se mantiene 50 minutos. Tras ese tiempo se desciende hasta 200°C con una rampa de -200°C/min y se mantiene 68 minutos.

Al igual que en GC-O, se inyectó una mezcla de alcanos en las mismas condiciones que los extractos, para localizar las zonas.



Figura 5: GC-MS

4. Resultados

4.1 Identificación de los compuestos odorantes

4.1.1 Tratamiento de datos

- Cálculo del índice de retención de Kovats

Una vez obtenidas todas las olfatométricas, y que cada juez haya realizado tanto la primera parte como la segunda, agrupamos por similitud en el aroma y por índices de retención (IR).

Para calcular los índices de retención, se inyecta una disolución de una mezcla de alcanos en las mismas condiciones cromatográficas que las extractos.

Se aplica esta fórmula:

$$IR = (100 * z) + 100 * \frac{\log t_x - \log t_z}{\log t_y - \log t_z}$$

donde:

t_z tiempo de retención del alcano anterior

t_y tiempo de retención del alcano posterior

t_x tiempo de retención del compuesto

z número de átomos de C del alcano anterior

En la siguiente figura se ve el cromatograma de la disolución de la mezcla de alcanos utilizada:

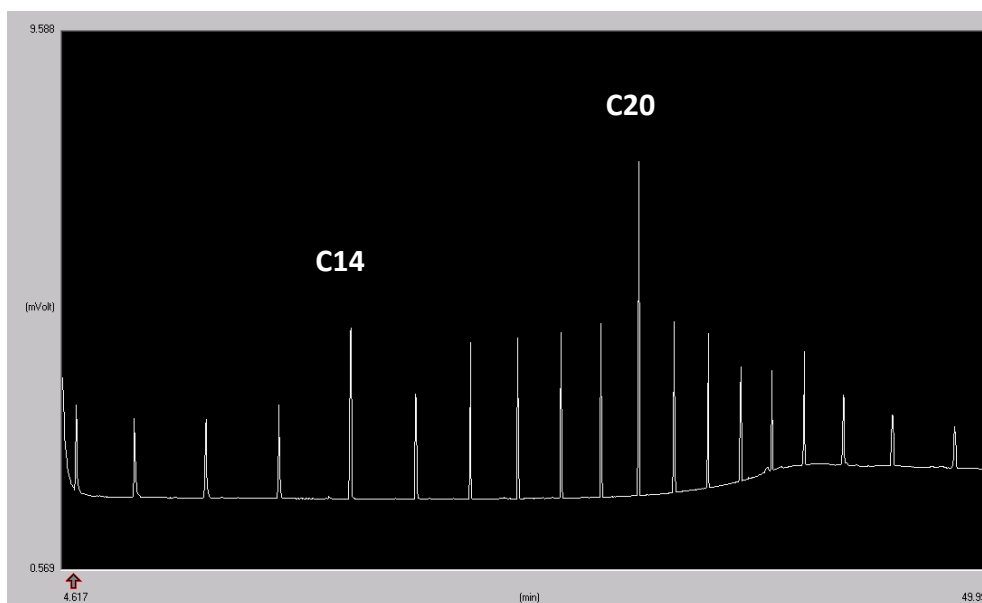


Figura 6: Cromatograma de la disolución de alcanos

- Cálculo de la frecuencia modificada

Conocidos ya los índices de retención, hay que calcular las frecuencias modificadas (%FM).

$$\%FM = \sqrt{\left(\frac{\text{suma intensidad aroma}}{18} * 100\right) * \left(\frac{\text{número personas que lo huelen}}{6} * 100\right)}$$

Calculadas ya las frecuencias modificadas, seleccionaremos aquellas zonas de olor donde %FM > 30 ya que tienen una importancia significativa en la manzana.

4.1.2 Identificación de compuestos responsables del aroma en las diferentes manzanas

En las siguientes tablas se pueden observar las distintas moléculas que se han identificadas en cada una de las muestras de manzanas, con sus valores de frecuencia modificada (FM (%)), sus índices de retención en DBWAX y DB5 y los descriptores proporcionados por los panelistas.

Además, mediante la inyección en el GC-MS, podemos confirmar compuestos que pueden formar parte del aroma de las manzanas.

La comparación de los índices de retención, descriptores y espectros de masas, así como la búsqueda en diferentes bases de datos (Flavornet, Pherobase), han permitido plantear la identificación de algunos compuestos responsables del aroma de las manzanas. Por ello, la confirmación de los diferentes compuestos tiene diversos niveles de confianza:

^A Coincidencia de los índices de retención en columna polar y apolar, descriptores aromáticos y localización en GC-MS.

^B Coincidencia de índices de retención en columna polar y apolar, descriptores pero en este caso no se ha conseguido un buen espectro de masas.

^C Coincidencia del índice de retención en columna polar, descriptores aromáticos y localización en GC-MS.

^D Coincidencia del índice de retención en columna polar y descriptores aromáticos.

^{n.i} Zona de olor no identificada.

Golden Delicious**Tabla 1:** Compuestos aromáticos identificados en Golden Delicious

IKDBWAX	IKDB5	Descriptor	Identificación	FM %	MS
913	<700	Verde, herbal, rancio	Isovaleraldehído ^D	43	-
1050	850	Fruta roja, fresa, medicina dulce	2-metilbutirato de etilo ^A	55	si
1076	850	Dulce, disolvente alcohólico, fruta	3-metilbutirato de etilo ^A	61	si
1083	801/815	Manzana, verde	Hexanal + Acetato de butilo ^A	75	si
1127	880	Alcohol, quitaesmalte	Acetato isoamilo ^A	47	si
1144	944	Frutal, dulce, fresa, cereza	2-metilpentanoato de etilo ^B	43	no
1154	801	Manzana, verde, pintañas	(Z)-3-hexenal ^B	48	no
1184	-	Fresa, piña	3-metilpentanoato de etilo ^C	31	si
1282	1012	Disolvente, plátano, pera, fruta blanca	Acetato de hexilo ^B	49	no
1309	980	Champiñón, metálico	1-octen-3-ona ^B	31	no
1371	871	Floral, frutal, ambientador, verde, limón	1-hexanol ^A	41	si
1382	980	Verde, disolvente, champiñón, geranio	(Z)-1,5-Octadien-3-ona ^B	35	no
1514	1144	Humedad, madera, rancio, vegetal	Z-2-nonenal ^B	59	no
1642	-	Rancio, vómito, láctico	Ácido butírico ^C	47	si
1824	-	Cloro, corcho, humedad, metal	TCA ^D	35	no
2025	-	Corcho, humedad, caramelo	n.i	41	-
2189	1366	Café, tostado, cocido, clavo	Eugenol ^A	31	si
2196	-	Fenólico, chocolate, tostado	4-etilfenol ^D	33	no

Como se puede observar en la tabla 1, en la muestra Golden Delicious se ha conseguido detectar un total de 18 zonas de olor diferentes con una frecuencia igual o superior a 30, es decir, aquellas que tienen gran importancia en el aroma de la manzana. Conocemos las moléculas responsables de todas las zonas, excepto de una que aparece como no identificada.

Se puede ver que destaca la zona de olor de 1083 en columna polar por su alta frecuencia modificada (75%), que corresponde a hexanal y acetato de butilo. En este caso los compuestos en la columna polar coeluyen, mientras que en la columna apolar se pueden diferenciar.

Además, para poder comprobar la presencia o ausencia de algunos compuestos, se usaron patrones. Para estos, al estar en concentraciones elevadas, y tener olores muy fuertes, hay que hacer diluciones. Concretamente, se utilizó el patrón de TCA.

Granny Smith**Tabla 2:** Compuestos aromáticos identificados en Granny Smith

IKDBWAX	IKDB5	Descriptor	Identificación	FM %	MS
970	760	Mantequilla, fresa-nata, fruta, dulce	Isobutirato de etilo ^B	50	-
1033	801	Frutal, dulce, fresa, manzana verde	Butirato de etilo ^A	70	si
1050	849	Dulce, frutal, fresa	2-metilbutirato de etilo ^A	73	si
1071	849	Dulce, medicina, fresa, frutal	3-metilbutirato de etilo ^A	46	si
1080	801	Rancio, verde, vegetal	Hexanal ^A	83	si
1136	-	Fruta pasada, plástico, plátano	Acetato isoamilo ^C	29	si
1145	<700	Verde, vegetal, manzana verde	(E)-1-penten-3-ol ^D	59	no
1242	997	Dulzón, anisado, frutal	Hexanoato de etilo ^A	47	si
1443	1199	Floral, ambientador	Octanoato de etilo ^A	33	si
1518	1153	Grasa, plástico, vegetal, verde	(Z)-2-nonenal ^B	29	no

Como se puede observar en la tabla 2, en la muestra Granny Smith se ha conseguido detectar un total de 10 zonas de olor. De todas ellas conocemos las moléculas responsables.

Con una alta frecuencia modificada podemos destacar los ésteres butirato de etilo (70%) y el 2-metilbutirato de etilo (73%). Ambos han sido localizados en el GC-MS y coinciden los índices de retención en columna polar y apolar y los descriptores aromáticos con los datos bibliográficos.

Reineta**Tabla 3:** Compuestos identificados en Reineta

IKDBWAX	IKDB5	Descriptor	Identificación	FM %	MS
974	759	Frutal, dulce, gominola, frutal, fresa	Isobutirato de etilo ^B	78	-
1012	765	Fresa, dulce, medicina, fruta blanca	Acetato de isobutilo ^B	76	-
1038	803	Frutal, dulce, manzana, fresa ácida	Butirato de etilo ^A	83	si
1055	852	Fruta, dulce, fresa	2-metilbutirato de etilo ^A	88	si
1074	852	Frutal, fresa ácida, pegamento, ambientador	3-metilbutirato de etilo ^A	45	si
1085	803	Hierba, vegetal, verde	Hexanal ^A	56	si
1142	876	Dulce, frutal, floral, fresa	Acetato de isoamilo ^A	62	si
1149	899	Frutal, verde, trigo, cereal cocido	Pentanoato de etilo ^A	41	si
1242	1002	Frutal, medicina, anisado	Hexanoato de etilo ^A	88	si
1310	982	Champiñón, metálico, especiado	1-octen-3-ona ^B	38	no
1516	1156	Rancio, vegetal, champiñón, cloro, corcho	Z-2-nonenal ^B	51	no
1823	1361	Corcho, humedad, cloro	TCA ^B	33	no

Como se puede observar en la tabla 3, en la muestra Reineta se ha conseguido detectar un total de 12 zonas de olor. De todas ellas conocemos las moléculas responsables.

Los compuestos identificados destacados en la muestra anterior (Granny Smith), butirato de etilo y el 2-metilbutirato de etilo también están presentes en la Reineta con una frecuencia modificada aún superior en esta. A continuación, se adjunta un ejemplo del 2-metilbutirato de etilo, identificado en el GC-MS:

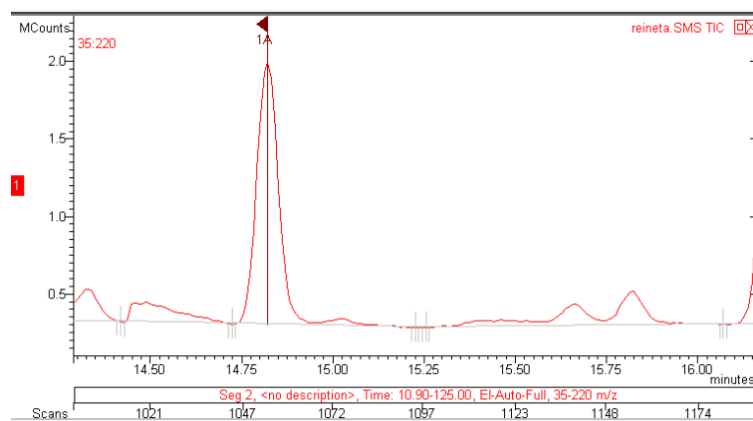


Figura 7: Cromatograma obtenido para el 2-metilbutirato de etilo

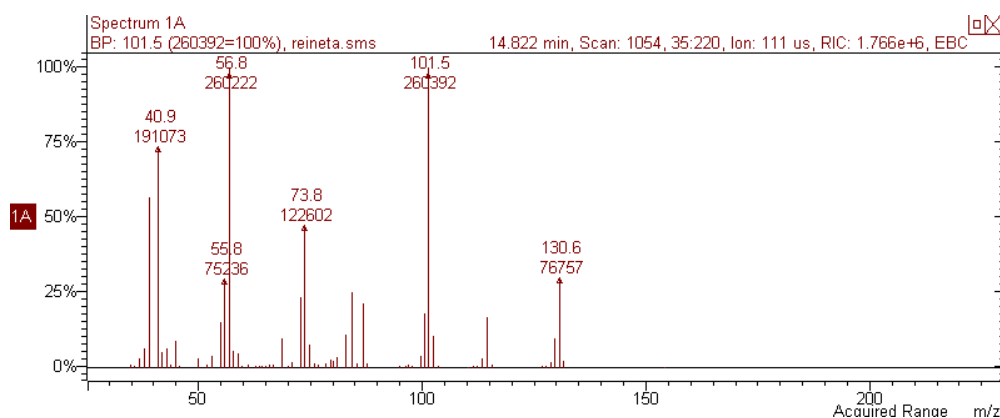


Figura 8: Espectro de masas obtenido para el 2-metilbutirato de etilo

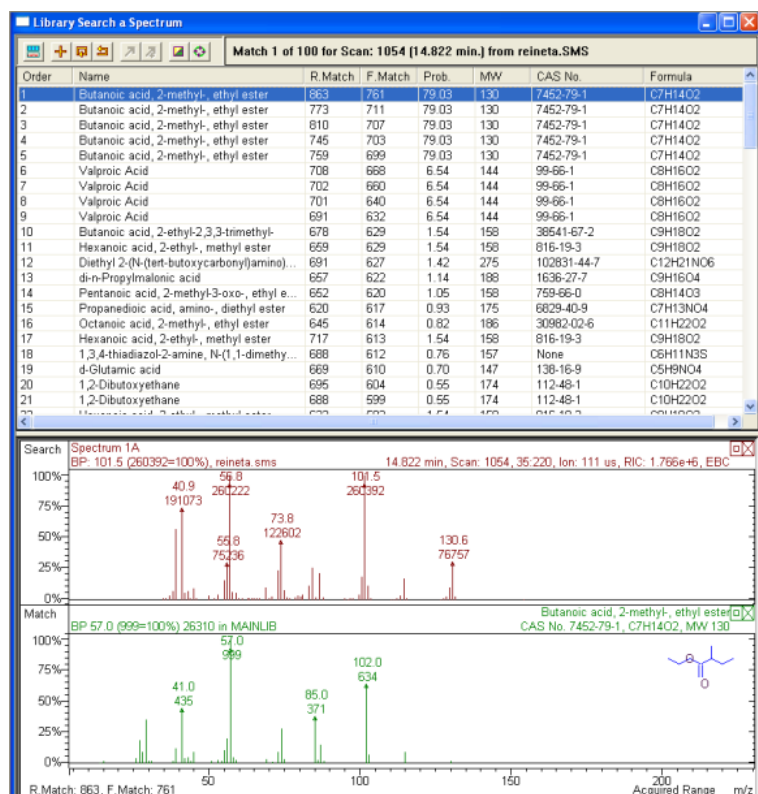


Figura 9: Búsqueda en la librería

Fuji**Tabla 4:** Compuestos aromáticos identificados en Fuji

IKDBWAX	IKDB5	Descriptor	Identificación	FM %	MS
1039	806	Frutal, dulce, fresa	Butirato de etilo ^A	59	si
1053	853	Fruta dulce, fresa, medicina	2-metilbutirato de etilo ^A	83	si
1075	853	Dulce, pegamento, quitaesmalte	3-metilbutirato de etilo ^B	39	no
1084	818	Verde, vegetal	Hexanal ^A	70	si
1128	884	Rotulador, quitaesmalte, pegamento, plátano	Acetato de isoamilo ^A	57	si
1223	-	Queso, vegetal, seco, lácteo	(S)-2-metil-1-butanol ^C	31	si
1242	1001	Frutal, dulce, anisado	Hexanoato de etilo ^A	50	si
1515	-	Vegetal, rancio, grasa, corcho	Z-2-nonenal ^D	39	no
1621	-	Cloro, plastilina, carton, champiñón	Z-2-decenal ^D	38	no
1720	-	Miel, rancio, grasa	n.i	45	no

Como se puede observar en la tabla 4, en la muestra Fuji se ha conseguido detectar un total de 10 zonas de olor diferentes. Conocemos las moléculas responsables de todas las zonas, excepto de una que aparece como no identificada.

En cuanto a los ésteres hay varios presentes en todas las muestras anteriores como puede ser por ejemplo el 2-metilbutirato de etilo, con una alta frecuencia modificada. Además podemos destacar la presencia de aldehídos (hexanal, Z-2-nonenal, Z-2-decenal) y alcoholes ((S)-2-metil-1-butanol), pero con una menor frecuencia.

5. Discusión

5.1 Obtención del extracto representativo de las manzanas

Para obtener el extracto representativo de la manzana es necesario la captura de compuestos volátiles del espacio de cabeza y para ello se lleva a cabo un sistema de P&T-SPE. Este sistema se ha utilizado en el LAEE para diferentes alimentos y se han conseguido obtener muy buenos resultados.

Entre todos los posibles sorbentes para la extracción, se ha utilizado la resina LiChrolut® EN (polímero de etilvinilbenceno-divinilbenceno). Esto es debido a que tiene una superficie específica extremadamente grande y una excelente capacidad de adsorción para sustancia orgánicas polares⁽¹⁵⁾.

Hay un estudio en el que se comparan las resinas poliméricas de nueva generación como puede ser LiChrolut® EN con el sorbente de referencia, Tenax TA, y se llega a la conclusión que la retención del primero es 200 veces más fuerte⁽¹⁶⁾. Además, se sabe que este último, es particularmente adecuado para volátiles no polares a semipolares, pero, muchos volátiles de muestras ambientales y biológicas poseen un carácter bastante polar⁽¹⁷⁾.

Durante la extracción es muy importante controlar las condiciones a lo largo de las 6 horas, comprobando que el caudal de N_2 no varía. Además, se añaden geles de refrigeración alrededor del cartucho, cada aproximadamente 30 minutos, para evitar que los compuestos más volátiles se pierdan. Cuando se cambia el gel, hay que verificar las condiciones y así poder asegurarnos que no hay fugas en el cartucho.

Después, hay que secar la resina, ya que la elución de los volátiles es con una disolución orgánica de 95% CH_2Cl_2 y 5% Metanol. Para ello, se añade gota a gota para evitar que se formen caminos en la resina. Luego, se agrega el estándar interno, para la calibración, y el sulfato de sodio, que tiene propiedades higroscópicas y se utiliza como desecante.

Para terminar, hay que concentrar el extracto para la detección correcta tanto por GC-O como por GC-MS, por lo que se añade una corriente muy suave de N_2 hasta llegar a 200 μ l.

5.2 Comparación entre las diferentes manzanas

Entre los compuestos volátiles identificados en las manzanas se encuentran: ésteres, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos. Los ésteres representan un alto porcentaje del total, en manzanas Golden ocupan un 80% y en la Fuji un 90%. De todos estos compuestos volátiles, solo una parte tiene gran relevancia en la calidad sensorial de las manzanas (“compuestos de impacto”) ⁽²⁾.

En la tabla 5 se muestra la comparación de los compuestos identificados en las diferentes manzanas: GD (Golden Delicious), GS (Granny Smith), R (Reineta) y F (Fuji).

En total hay 27 compuestos identificados, algunos de ellos presentes en las cuatro muestras (marcados en verde).

En cuanto a los compuestos comunes en todas las muestras, destacan los ésteres: acetato de isobutilo, butirato de etilo, 2-metilbutirato de etilo, 3-metilbutirato de etilo y acetato de isoamilo. Se podría decir que forman parte de la base del aroma de la manzana, siendo descritos como frutal, dulce, quitaesmalte, entre otros. También está el hexanal, que se encuentra en las cuatro muestras por encima del 50% dando el olor a manzana característico (vegetal, verde, manzana). Además también destaca la presencia de 1-octen-3-ona, con descriptores como champiñón, metálico y (Z)-2-nonenal, como humedad, madera, grasa, entre otros. De estos dos compuestos no se ha conseguido un buen espectro de masas.

En contraposición, hay compuestos que únicamente destacan en una muestra, como puede ser el acetato de butilo en la Golden Delicious. Otros en cambio, están presentes en todas las muestras

menos en una, como puede ser el hexanoato de etilo, con una alta frecuencia modificada en Granny Smith, Reineta y Fuji.

La mayoría de los compuestos identificados también son encontrados en diferentes estudios realizados anteriormente ⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾.

Los componentes volátiles son diferentes en cada clase y la percepción sensorial también para cada tipo de fruta y variedad. En el caso de la Golden Delicious, son predominantes los ésteres, y son los que dan el olor característico a “manzana” principalmente debido al acetato de butilo con un toque de sabor dulce, y afrutado dado por el acetato de hexilo. Además el 1-hexanol contribuye a esa sensación dulce ⁽²⁰⁾.

Cabe destacar, el 2,4,6-tricloroanisol (TCA) que está presente en la Golden Delicious y Reineta, con un descriptores como humedad, corcho entre otros. Es un compuesto que se ha identificado como el responsable de la contaminación del corcho en el vino y además como el causante del mal sabor en alguna bebida alcohólica ⁽²¹⁾.

El 4-etilfenol, también se encuentra en varios tipos de manzanas. Este tipo de compuestos, están presentes en la piel y en la pulpa ⁽²²⁾.

Además, el E-2-hexenal es un compuesto muy destacado en las manzanas ⁽³⁾, pero no se pudo determinar mediante la olfatometría. El, junto con el hexanal, y el acetato de hexilo son compuestos utilizados para la mejora de la seguridad de las frutas procesadas ⁽²³⁾.

Tabla 5: Comparación de los aromas importantes de las diferentes muestras

Identificación	Frecuencia modificada (FM%)			
	GD	GS	R	F
Isovaleraldehído	43	-	-	-
Isobutirato de etilo	-	50	78	14
Acetato de isobutilo	17	14	76	29
Butirato de etilo	26	70	83	59
2-metilbutirato de etilo	55	73	88	83
3-metilbutirato de etilo	61	46	45	39
Hexanal	-	83	56	70
Hexanal + Acetato de butilo	75	-	-	-
Acetato de isoamilo	47	29	62	57
2-metilpentanoato de etilo	43	-	-	-
1-penten-3-ol	-	59	-	-
Pentanoato de etilo	-	-	41	-
(Z)-3-hexenal	48	-	-	-
3-metilpentanoato de etilo	31	-	22	-
(S)-2-metil-1-butanol	-	-	-	31
Hexanoato de etilo	-	47	88	50
Acetato de hexilo	49	-	-	-
1-octen-3-ona	31	25	38	24
Hexan-1-ol	41	-	-	-
(Z)-1,5-Octadien-3-ona	35	19	26	-
Octanoato de etilo	-	33	25	-
(Z)-2-nonenal	59	29	51	39
(Z)-2-decenal	-	-	-	38
Acido butirico	47	-	-	-
TCA	35	-	33	-
Eugenol	31	-	-	-
4-etilfenol	33	29	-	-

Por último, en la siguiente figura se observa el cromatograma de las 4 muestras solapadas. Como se puede apreciar, predomina el color morado, que corresponde a la Golden Delicious, y podemos concluir que, a pesar de que el extracto está preparado en las mismas condiciones que todos los demás, hay mayor concentración en la Golden Delicious. Además, esto también se pone de manifiesto en los picos del GC-MS.

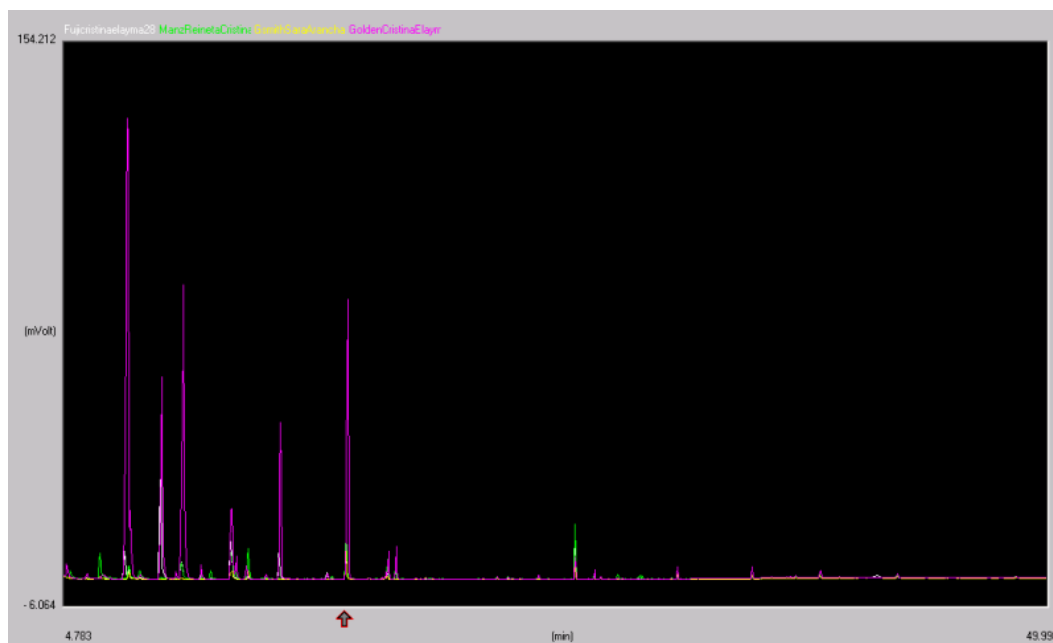


Figura 10: Cromatogramas solapados de las 4 muestras de manzanas

6. Conclusiones

Mediante el sistema de P&T-SPE basado en la retención en el sorbente LiChrolut® EN se consiguieron extractos representativos de manzanas Golden Delicious, Granny Smith, Reineta y Fuji. Estos extractos fueron sometidos primero a GC-O para caracterizar las zonas odorantes y posteriormente elucidar químicamente dichos odorantes. De esta forma se consiguieron identificar un total de 27 compuestos, algunos de ellos presentes en las cuatro muestras.

Por un lado, hay compuestos comunes, sobre todo ésteres como el acetato de isobutilo, butirato de etilo, 2-metilbutirato de etilo, 3-metilbutirato de etilo y acetato de isoamilo, que son los que forman parte de la base del aroma de la manzana. También cabe destacar la presencia del hexanal, con una frecuencia modificada por encima del 50%, dando el olor característico de la manzana. Además hay compuestos que tienen gran importancia como el Z-2-nonenal y 1-octen-3-ona pero ya con descriptores, no tan agradables, como rancio, champiñón o metálico entre otros.

Por otro lado, hay algunos que están presentes en una sola muestra como puede ser el acetato de butilo o el 1-penten-3-ol, con una alta frecuencia modificada.

Es muy importante este tipo de estudios ya que gracias a ellos, se consigue asegurar la calidad de los alimentos y además mejorar la aceptación por parte del consumidor.

7. Bibliografía

1. El Hadi MAM, Zhang FJ, Wu FF, Zhou CH, Tao J. Advances in fruit aroma volatile research. *Molecules*. 2013;18(7):8200–29.
2. Salas Salazar NA, Olivas Orozco GI. El Aroma De La Manzana. *Interciencia*. 2011;36:271–365.
3. Espino-Díaz M, Sepúlveda DR, Gustavo González-Aguilar and Guadalupe I. Olivas. Biochemistry of Apple Aroma: A review. *Food technology and biotechnology*. 2016;54(4):375–94.
4. Aceña Muñoz L. Aplicación de cromatografía de gases-olfatometria en la caracterización del aroma del vinagre de vino, de los pistachos y del aceite de oliva. Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España; 2011.
5. Fuller GH, Steltenkamp R, Tisserand GA. The gas chromatograph with human sensor: perfumer model. *Annals of the New York Academic Science*. 1964;116(2):711–24.
6. Diaz-Maroto MC, Perez-Coello MS. Investigación Química Análisis de los compuestos responsables del aroma de las especias. *Analisis Quimicos*. 2006;102(3):31–5.
7. Van Ruth SM. Methods for gas chromatography-olfactometry: a review. *Biomolecular Engineering*. 2001;17(4–5):121–8.
8. d'Acampora Zellner B, Dugo P, Dugo G, Mondello L. Gas chromatography-olfactometry in food flavour analysis. *Journal of Chromatography. A*. 2008;1186(1–2):123–43.
9. Rodríguez-Bernaldo de Quirós AI, González-Castro MJ, López-Hernández J, Simal-Lozano J. Técnicas analíticas aplicadas a la determinación de compuestos aromáticos en alimentos vegetales. *Revista de tecnología e higiene de los alimentos*. 1996;15(May):73–9.
10. Morales MT, Aparicio R, Gutiérrez F. Técnicas de aislamiento y concentración de volátiles de aceites vegetales. *Grasas y Aceites*. 1992;43(3):164–73.
11. Antón Díaz MJ. Influencia del origen y la tecnología de elaboración sobre el perfil aromático y olfatométrico de la sidra. Universidad de Oviedo; 2015.
12. Maria J, Cunill G, Optar PER, Grau a L, Enginyer DED. Estudio de los parámetros para la determinación de los compuestos orgánicos volátiles de la oleorresina de pimentón. Universidad politecnica de Cataluña; 1994.

13. Ferreira V, Pet'ka J, Aznar M, Cacho J. Quantitative gas chromatography-olfactometry. Analytical characteristics of a panel of judges using a simple quantitative scale as gas chromatography detector. *Journal of Chromatography A*. 2003;1002(1–2):169–78.
14. Angel Manuel Aragón Capone. Trabajo de Fin de Grado: Caracterización química del aroma y sabor de frutas autóctonas aragonesas. 2019.
15. Merckmillipore. Polymer-based SPE. Disponible en:
http://www.merckmillipore.com/ES/es/analytics-and-sample-preparation/solid-phase-extraction/polymerbasedspe/_FCb.qB.ZGMAAFCecZJ3_ww,nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F&bd=1
16. López P, Batlle R, Nerín C, Cacho J, Ferreira V. Use of new generation poly(styrene-divinylbenzene) resins for gas-phase trapping-thermal desorption. Application to the retention of seven volatile organic compounds. *Journal of Chromatography A*. 2007;1139(1):36–44.
17. Andrea Marcillo, Viktorija Jakimovska, Anja Widdig CB. Comparison of two common adsorption materials for thermal desorption gas chromatography – mass spectrometry of biogenic volatile organic compounds. *Journal of Chromatography A*. 2017;1514:16–28.
18. Liu X, Deng J, Bi J, Wu X, Zhang B. LWT - Food Science and Technology Cultivar classification of cloudy apple juices from substandard fruits in China based on aroma profile analyzed by HS-SPME / GC-MS. *LWT - Food Science and Technology*. 2019;102(July 2018):304–9.
19. M. Filmena Valim RLR y JL. Gas Chromatographic – Olfactometric Characterization of Aroma Compounds in Two Types of Cashew Apple Nectar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003;51(4):1010–5.
20. M.L. Lopez, M.T. Lavilla MR y MV. Comparison of Volatile Compounds in two seasons in apples: Golden Delicious and Granny Smith. 1997;21(Paillard 1981):155–66.
21. Miki A, Isogai A, Utsunomiya H, Iwata H. Identification of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) causing a musty/muddy off-flavor in sake and its production in rice koji and moromi mash. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2005;100(2):178–83.
22. Escarpa A, González MC. High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *Journal of Chromatography A*. 1998;823(1–2):331–7.

23. Rosalba Lanciotti, Nicoletta Belletti, Francesca Patrignani, Andrea Gianotti FG y MEG. Application of Hexanal , (E)-2-Hexenal , and Hexyl Acetate To Improve the Safety of Fresh-Sliced Apples. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003;51:2958–63.